

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2006 The Thomson Corporation. All rts. reserv.

0004250197

WPI ACC NO: 1987-059579/198709

Patent Assignee: OSAKA YAKUHHIN KENKYUSHO KK (OSYK)

Inventor: KADOTA A; UCHIDA Y

Patent Family (1 patents, 1 countries)

Patent

Application

| Number | Kind | Date | Number | Kind | Date | Update |
|-------------|------|----------|---------------|------|----------|----------|
| JP 62012791 | A | 19870121 | JP 198150190 | A | 19810401 | 198709 B |
| | | | JP 1986169997 | A | 19810407 | |
| | | | JP 1986169996 | A | 19850711 | |

Priority Applications (no., kind, date): JP 198150190 A 19810401

Patent Details

| Number | Kind | Lan | Pg | Dwg | Filing | Notes |
|-------------|------|-----|----|-----|--------|-------|
| JP 62012791 | A | JA | | 0 | | |

Alerting Abstract JP A

Saponin cpd. (I) and its salts are new. To obtain (I) Astragali Radix is extracted by lower alcohol, the extracted soln. is conc. and treated by adsorbent. The eluent fractions are treated at least once by chromatography. (I) is purified and sepd.

Chromatography is pref. reversed phase silica gel column chromatography or silica gel column chromatography. The lower alcohol is pref. MeOH or EtOH. Adsorbent is pref. silica gel.

USE - Peroxide lipid formation inhibitor is claimed which is composed of (I) or its pharmaceutically acceptable salts and fillers. It is useful for prophylaxis and treatment of arteriosclerosis.

L2 ANSWER 1 OF 2 HCA COPYRIGHT 2006 ACS on STN

AN 108:35006 HCA

ED Entered STN: 06 Feb 1988

TI Preparation of medicinal saponins from Astragalus membranaceus roots

IN Kadota, Akimi; Uchida, Yoshihiro

PA Osaka Yakuhin Kenkyusho K. K., Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 11 pp.

LA Japanese

| PATENT NO. | KIND | DATE | APPLICATION NO. | DATE |
|---------------------|------|----------|-----------------|----------|
| PI JP 62012791 | A | 19870121 | JP 1986-169996 | 19860718 |
| PRAI JP 1986-169996 | | 19860718 | | |

GI For diagram(s), see printed CA Issue.

AB Saponins, such as astragaloside VIII (I), isolated from A. membranaceus roots are agents that inhibit lipid peroxide formation in humans and animals. A. membranaceus Roots, (8 kg) were refluxed with MeOH. The MeOH ext. was concd. under reduced pressure. The conc. (200 g) was dissolved in MeOH and fractionated by column chromatog. on silica gel using CHCl₃-MeOH-H₂O mixts. as eluants. Each fraction was worked up by reverse chromatog. on silica gel using similar solvent mixts. to give acetylastragaloside I 0.2, astragaloside I 3.5, isoastragaloside I 0.3, astragaloside II 2.3, astragaloside III 1, astragaloside IV 0.8, astragaloside V 0.1, astragaloside VI 0.3, astragaloside VII 0.1, I 0.6, and soyasaponin I 0.6 g. All the above saponins markedly inhibited the formation of lipid peroxides induced by i.p. administration of adriamycin (15 mg/kg) in rats.

⑫ 公開特許公報 (A)

昭62-12791

⑤ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)1月21日

C 07 H 15/256

A 61 K 31/705

ABX

7330-4C

ADP

C 07 H 1/08

審査請求 未請求 発明の数 3 (全11頁)

⑭ 発明の名称 オウギサポニン、その単離法およびその用途

⑯ 特 願 昭61-169996

⑰ 出 願 昭56(1981)4月1日

⑱ 特 願 昭56-50190の分割

⑲ 発 明 者 門 田 暁 美 福山市鞆町804

⑲ 発 明 者 内 田 義 弘 大阪市大正区泉尾1-22-23

⑲ 出 願 人 株式会社 大阪薬品研 大阪市東区北浜1丁目27
究所

⑲ 代 理 人 弁理士 野河 信太郎

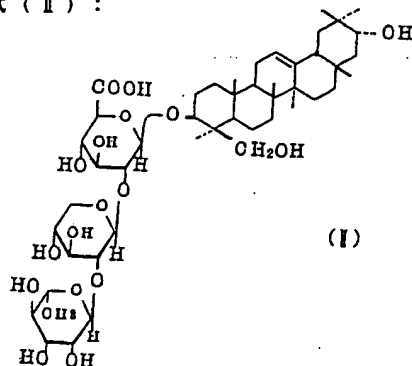
明 細 書

1. 発明の名称

オウギサポニン、その単離法およびその用途

2. 特許請求の範囲

1. 式 (I) :

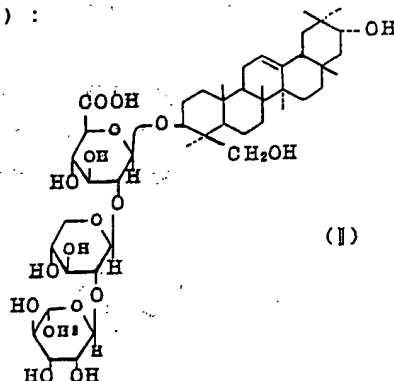


で表されるサポニン化合物又はその医薬的に受容な塩。

2. オウギ (Astragali Radix) を低級アルコールで抽出し、その抽出液を濃縮し、この濃縮液の低級アルコール溶液を吸着剤で処理し、次いで溶離して得た画分を少なくとも1回のクロマト

グラフィに付して精製分離し、

式 (II) :



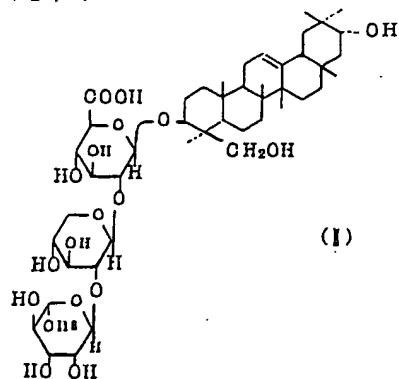
で表されるサポニン化合物を得ることを特徴とするサポニン化合物の単離法。

3. クロマトグラフィが逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィ又はシリカゲルカラムクロマトグラフィである特許請求の範囲第2項記載の方法。

4. 低級アルコールがメタノール又はエタノールである特許請求の範囲第2項記載の方法。

5. 吸着剤がシリカゲルである特許請求の範囲第2項記載の方法。

6. 式(Ⅱ):



で表されるサポニン化合物又はその医薬的に受容な塩と医薬的に受容な賦形剤とからなる過酸化脂質生成抑制剤。

(以下余白、次頁に続く。)

3. 発明の詳細な説明

この発明はオウギ(黄耆)より単離されたサポニン類及びその単離法に関する。

この発明にいうオウギ(黄耆)はマメ科 Leguminosae のオウギ *Astragalus membranaceus* Bunge 又はその他の同属植物の根を意味する。オウギは古来より生薬として強壮、強心、利尿、止汗、血圧降下剤などに用いられる。オウギの成分としては、従来イソフラボン酸類、イソフラバノン酸類、ペタイン、ピペリジン酸、庶糖などが含まれていることが知られている。しかしサポニン配糖体類が含まれているということは全く知られていない。

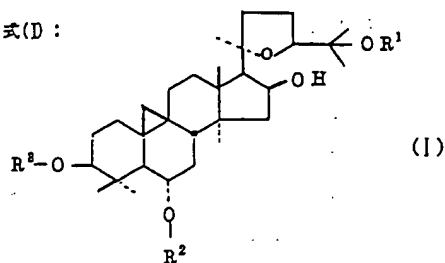
この発明の発明者らはオウギから実質的に純粋

(以下余白、次頁に続く。)

なサポニンを単離し、さらにこの中に少なくとも10種の文献未知のサポニンが含まれていることを見出した。

かくして、この発明によれば実質的に純粋なサポニン混合物並びにその成分である下記の式(I)及び式(Ⅱ)で表される化合物およびその塩類が提供される。

式(D):

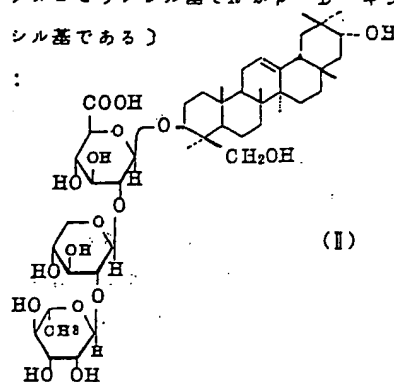


(式中 R^1 が水素原子であるときは、 R^2 が β -D-グルコピラノシル基で R^3 が2, 3, 4-トリ-O-アセチル- β -D-キシロピラノシル基; R^2 が β -D-グルコピラノシル基で R^3 が2, 3-ジ-O-アセチル- β -D-キシロピラノシル基; R^2 が β -D-グルコピラノシル基で R^3 が2, 4-ジ-

-O-アセチル- β -D-キシロピラノシル基; R^2 が β -D-グルコピラノシル基で R^3 が2-O-アセチル- β -D-キシロピラノシル基; R^2 が β -D-グルコピラノシル基で R^3 が β -D-キシロピラノシル基; R^2 が β -D-グルコピラノシル基で R^3 が β -D-グルコピラノシル(1-2) β -D-キシロピラノシル基又は R^2 が水素原子で R^3 が β -D-グルコピラノシル(1-2) β -D-キシロピラノシル基;

R^1 が β -D-グルコピラノシル基であるときは、 R^2 が水素原子で R^3 が β -D-グルコピラノシル(1-2) β -D-キシロピラノシル基又は R^2 が β -D-グルコピラノシル基で R^3 が β -D-キシロピラノシル基である)

式(Ⅱ):



これらサポニンの具体名を列举すると次のとおりである。

3-O-(2,3,4-トリ-O-アセチル-β-D-キシロピラノシル)-6-O-β-D-グルコピラノシル-サイクロアストラゲノール
〔アセチルアストラガロサイドⅠと称す〕、

3-O-(2,3-ジ-O-アセチル-β-D-キシロピラノシル)-6-O-β-D-グルコピラノシル-サイクロアストラゲノール
〔アストラガロサイドⅡと称す〕、

3-O-(2,4-ジ-O-アセチル-β-D-キシロピラノシル)-6-O-β-D-グルコピラノシル-サイクロアストラゲノール
〔イソアストラガロサイドⅢと称す〕、

3-O-(2-O-アセチル-β-D-キシロピラノシル)-6-O-β-D-グルコピラノシル-サイクロアストラゲノール
〔アストラガロサイドⅣと称す〕、

3-O-(β-D-グルコピラノシル(1-2)-β-D-キシロピラノシル)-サイクロアストラ

ゲノール
〔アストラガロサイドⅤと称す〕、

3-O-β-D-キシロピラノシル-6-O-β-D-グルコピラノシル-サイクロアストラゲノール
〔アストラガロサイドⅥと称す〕、

3-O-(β-D-グルコピラノシル(1-2)-β-D-キシロピラノシル)-25-O-β-D-グルコピラノシル-サイクロアストラゲノール
〔アストラガロサイドⅦと称す〕、

3-O-(β-D-グルコピラノシル(1-2)-β-D-キシロピラノシル)-6-O-β-D-グルコピラノシル-サイクロアストラゲノール
〔アストラガロサイドⅧと称す〕、

3-O-β-D-キシロピラノシル-6-O-β-D-グルコピラノシル-25-O-β-D-グルコピラノシル-サイクロアストラゲノール
〔アストラガロサイドⅨと称す〕、及び

3-O-(α-L-ラムノピラノシル(1-2)-β-D-キシロピラノシル(1-2)-β-D-グルクロノピラノシル)-ソーヤサポゲノールB
〔アストラガロサイドⅩと称す〕である。

この発明のサポニンは実質的に純粋であり、この「実質的に純粋」とは、サポニンのみを少なくとも90%以上好ましくは98%以上含むことを意味する。

また、この発明は、オウギ(Astragali Radix)を低級アルコールで抽出し、その抽出液を濃縮し、この濃縮液の低級アルコール溶液を吸着剤で処理し、次いで溶離して得た画分をエステル化せず又はエステル化して少なくとも1回のクロマトグラフィーに付して精製分離し、前記の新規サポニンを単離する方法が提供される。以下具体的に説明する。

最初に、オウギを低級アルコールで抽出する。低級アルコールとしては99%以上のメタノール又はエタノール等が挙げられる。この抽出は加温又は加熱下に行うのが好ましい。なお原料のオウギは抽出に先立つて予め細切し、あるいは常法により脱脂したものを用いてもよい。得られた抽出液を濃縮して抽出エキスを調製する。この抽出エキスを低級アルコールに溶解し、その溶液をシリカゲル

例えばメルク社製60~230メッシュシリカゲルにまぶす。なお抽出エキスの低級アルコール溶液の濃度はシリカゲルにまぶしやすいよう適宜選択される。この抽出物付着シリカゲルを予めシリカゲルを充填したカラムの上に積層する。この予め充填したシリカゲルは抽出物付着シリカゲルの5~20倍重量が用いられる。このシリカゲルカラムを、例えばクロロホルム：低級アルコール：水で好ましくはクロロホルム：メタノール：水(10:3:1(下層)→6:4:1)で傾斜溶離し、薄層クロマトグラフィー(TLC)を指標として溶出液を6分画し、各分画液を濃縮乾燥して分画1~6を得る。

これらの分画の中、分画1及び5は逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(例えば担体としてはボンダパックC18、ウォータース社製が挙げられ、溶出溶媒としては低級アルコール：水好ましくはメタノール：水(5:4~5:1)で溶出)に付して分離精製後、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー(例えば、担体としてメルク社製

60～230メツシユシリカゲルが挙げられ、溶出溶媒としてはクロロホルム：低級アルコール：水好ましくはクロロホルム：メタノール：水(10：3：1，下層)に付して精製分離し、

分画2，3及び4は上記分画1及び5に用いたのと同様の逆相シリカゲルクロマトグラフィーに付して精製分離される。

さらに分画6は上記したのと同様の逆相シリカゲルクロマトグラフィーに付して得たサポニン混合物を低級アルコール好ましくはメタノールに溶解し、シアゾメタン-エーテル溶液を加えてメチルエステル化する。さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(例えば担体としては60～230メツシユ，メルク社製シリカゲルを用い、n-ブタノール：酢酸エチル：水(4：1：5，上層)で分離し、次いでアルカリ処理(例えば10%水酸化カリウム水溶液)に付して精製分離される。

上記のように分画1～6を精製分離すると、分画1からアセチルアストラガロサイドI，アストラガロサイドI及びイソアストラガロサイドIが、

分画2からアストラガロサイドIIが、分画3からはアストラガロサイドIIIが、分画4からアストラガロサイドIVが、分画5からアストラガロサイドV，アストラガロサイドVI及びアストラガロサイドVIIが、また分画6からアストラガロサイドVIII及びソ-ヤサポニンIがそれぞれ得られる。

これらサポニンは所望により塩に変換することができる。塩としては、アルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩、具体的にはナトリウム塩，カリウム塩，カルシウム塩，マグネシウム塩などが挙げられる。また、これらの塩は常法によつて作製される。

このようにして得られた新規のサポニンは過酸化脂質の生成を抑制する作用を有し、動脈硬化の予防，治療に利用可能で老化防止に有効である。

次に実施例によつてこの発明のサポニンの単離法を説明する。

実施例

オウギ(Astragali Radix)からのサポニンの抽出単離

オウギ(韓国産オウギ、8kg)を細切し、メタノール(18ℓ，99%メタノール、以下同じ)で5時間加熱還流する。濾過してメタノール抽出液を得、残渣に新たにメタノール(18ℓ)を加え加熱抽出する。同様の操作を計5回行い、得られるメタノール抽出液を合し、減圧にて溶媒留去してメタノール抽出エキスを(1.9kg)を得る。

メタノール抽出エキス(200g)をメタノールに溶解し、シリカゲル(60～230メツシユ、メルク社製、400g；この実施例で用いるシリカゲルは特別の説明がない場合このシリカゲルを意味する)にまぶす。減圧乾燥した後、シリカゲル(4kg)を充填したカラムに層積し、クロロホルム：メタノール：水(10：3：1(下層)(20ℓ)，7：3：1(下層)(10ℓ)，65：35：10(下層)(10ℓ)，6：4：1(10ℓ))を用い、シリカゲル薄層クロマトグラフィーを指標として順次溶出し、溶出液を6分画して分画1(22g)、分画2(7.5g)、分画3(10g)、分画4(7.5g)、分画5

(6.8g)および分画6(9.2g)を得る。

分画1(22g)を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(担体：ボンダパックO18，ウオーターズ社製，100g；溶出溶媒はメタノール：水(5：4～5：1))で分離精製後、さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル1kg，クロロホルム：メタノール：水(10：8：1，下層))で分離し、アセチルアストラガロサイドI(200mg)、アストラガロサイドI(3.5g)、およびイソアストラガロサイドI(300mg)を得た。

分画2(7.5g)を分画1の処理に用いたのと同様の逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製し、アストラガロサイドII(2.3g)を得た。

分画3(10g)からは分画1の処理に用いたのと同様の逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーによつて、アストラガロサイドIII(1.0g)が得られ、分画4(7.5g)からは分画8の処理と同様な操作によつて、アストラガロサイドIV(0.8

9) が得られた。

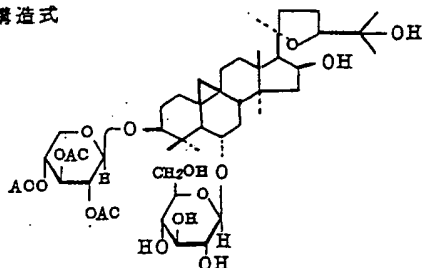
分面5(6.8g)を分面1の処理に用いたのと同様の逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィで分離精製後、シリカゲルカラムクロマトグラフィ〔シリカゲル, 700g; クロロホルム: メタノール: 水(7: 3: 1, 下層)〕で分離して、アストラガロサイドⅤ(100mg)、アストラガロサイドⅥ(300mg)、アストラガロサイドⅦ(100mg)を得た。

分面6(9.2g)を分面1の処理に用いたのと同様の逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィで分離精製し、サポニン混合物(2.5g)を得る。サポニン混合物(2.5g)をメタノールに溶解し、ジアゾメタン-エーテル溶液を加えメチルエステル化する。シリカゲルカラムクロマトグラフィ〔シリカゲル500g, n-ブタノール: 酢酸エチル: 水(4: 1: 5, 上層)〕で分離し、ついでアルカリ処理(10%水酸化カリウム水溶液)して、アストラガロサイドⅧ(600mg)およびソーヤサポニンI(600mg)を得た。

から結晶化)である。

- 8) メタノール, エタノール, n-ブタノール, ピリジン, ジメチルスルホキシドに易溶、クロロホルム, 酢酸エチル, アセトンに可溶、エーテル, ベンゼン, ヘキサンに不溶である。
- 9) 薄層クロマトグラフィ〔TLC, 担体: プレコートシリカゲル60F₂₅₄プレート, 0.25mm, メルク社製; 展開溶媒: クロロホルム: メタノール: 水(7: 3: 1, 下層)〕において R_f = 0.6を示す。
TLC上1%硫酸セリウム-10%硫酸水溶液を噴霧し、加熱すると濃茶かつ色を呈する。

10) 構造式



上記実施例で得られた各サポニンの物性は次のとおりである。

アセチルアストラガロサイドI

- mp 280~281°Cである。
- $[\alpha]_D^{18} + 1.8^\circ$ (C = 1.0, メタノール)の旋光性を有する。
- C₄₇H₇₄O₁₇の分子組成を有する。
- 赤外線吸収スペクトル(KBr, cm⁻¹)は3400(ブロード), 1750, 1225, 1030に特有の吸収極大を示す。
- 210nmより長波長には紫外線吸収を示さない。
- ¹³C核磁気共鳴スペクトル(d₅-ピリジン, δC)は170.1, 170.0, 169.5(アセチルカルボニルC), 105.0, 108.4(アノメリックC), 89.5(3-C), 87.3(20-C), 82.1(24-C), 79.3(6-C)等のシグナルを示す。
- 臭いはなく、無色の針状結晶(メタノール

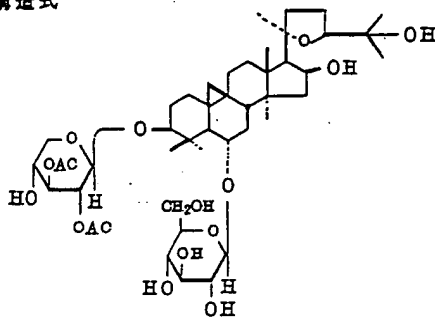
アストラガロサイドI

- mp 184~186°Cである。
- $[\alpha]_D^{18} + 12.7^\circ$ (C = 0.6, メタノール)の旋光性を有する。
- C₄₆H₇₂O₁₆・H₂Oの分子組成を有する。
- 赤外線吸収スペクトル(KBr, cm⁻¹)は3400(ブロード), 1784, 1258, 1086, 1045に特有の吸収極大を示す。
- 210nmより長波長には紫外線吸収を示さない。
- ¹³C核磁気共鳴スペクトル(d₅-ピリジン, δC)は170.6, 169.8(アセチルカルボニルC), 105.0, 104.1(アノメリックC), 89.4(3-C), 87.4(20-C), 82.2(24-C), 79.4(6-C)等のシグナルを示す。
- 臭いはなく、無色の微細結晶(アセトンから結晶化)である。
- メタノール, エタノール, n-ブタノール, ピリジン, ジメチルスルホキシドに易溶、

クロロホルム、酢酸エチル、アセトンに可溶、エーテル、ベンゼン、ヘキサンに不溶である。

- 9) 薄層クロマトグラフィ (TLC, 担体: プレコートシリカゲル 60 F₂₅₄ プレート, 0.25 mm, メルク社製; 展開溶媒: クロロホルム: メタノール: 水 (7:3:1, 下層)) において R_f = 0.5 を示す。
TLC 上 1% 硫酸セリウム - 10% 硫酸水溶液を噴霧し、加熱すると濃茶褐色を呈する。

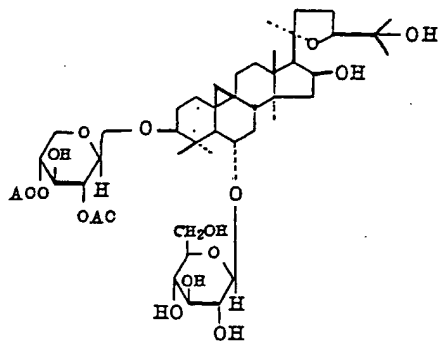
10) 構造式



クロロホルム、酢酸エチル、アセトンに可溶、エーテル、ベンゼン、ヘキサンに不溶である。

- 9) 薄層クロマトグラフィ (TLC, プレコートシリカゲル 60 F₂₅₄, 0.25 mm, メルク社製, クロロホルム: メタノール: 水 (7:3:1, 下層)) で R_f = 0.48 を示す。
TLC 上 1% 硫酸セリウム - 10% 硫酸水溶液を噴霧し、加熱すると濃茶褐色を呈する。

10) 構造式



イソアストラガロサイド I

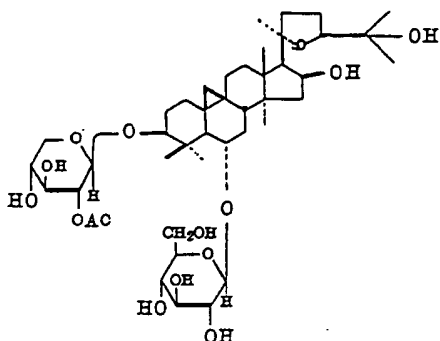
- mp 218 ~ 220 °C である。
- $[\alpha]_D^{18} + 17.9^\circ$ (C = 1.0, メタノール) の旋光性を有する。
- C₄₅H₇₂O₁₆ · H₂O の分子組成を有す。
- 赤外線吸収スペクトル (KBr, cm⁻¹) は 3400 (ブロード), 1740, 1230, 1050 に特有の吸収極大を示す。
- 210 nm より長波長には紫外線吸収を示さない。
- ¹³C 核磁気共鳴スペクトル (d₅-ピリジン, δC) は 170.5, 170.2 (アセチルカルボニル C), 105.0, 104.4 (アノメリック C), 89.3 (3-C), 87.2 (20-C), 82.2 (24-C), 79.5 (6-C) 等のシグナルを示す。
- 臭いはなく、無色の微細結晶 (クロロホルム-メタノールから結晶化) である。
- メタノール, エタノール, n-ブタノール, ピリジン, ジメチルスルホキシドに易溶、

アストラガロサイド II

- mp 251 ~ 258 °C である。
- $[\alpha]_D^{18} + 31.2^\circ$ (C = 1.4, メタノール) の旋光性を有する。
- C₄₅H₇₀O₁₆ · H₂O の分子組成を有する。
- 赤外線吸収スペクトル (KBr, cm⁻¹) は 3400 (ブロード), 1739, 1236, 1070, 1039 に特有の吸収極大を示す。
- 210 nm より長波長には紫外線吸収を示さない。
- ¹³C 核磁気共鳴スペクトル (d₅-ピリジン, δC) は 170.1 (アセチルカルボニル C), 105.0, 104.8 (アノメリック C), 89.2 (3-C), 87.4 (20-C), 82.2 (24-C), 79.4 (6-C) 等のシグナルを示す。
- 臭いはなく無色の微細結晶 (クロロホルム-メタノールから結晶化) である。
- メタノール, エタノール, n-ブタノール, ピリジン, ジメチルスルホキシドに易溶、

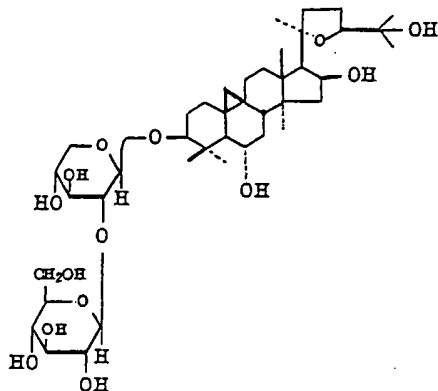
クロロホルム、酢酸エチル、アセトンに難溶、エーテル、ベンゼン、ヘキサンに不溶である。

- 9) 薄層クロマトグラフィ〔TLC, プレコートシリカゲル 60 F₂₅₄, 0.25 mm, メルク社製、クロロホルム：メタノール：水(7:3:1, 下層)〕で R_f = 0.45 を示す。TLC 上 1% 硫酸セリウム-10% 硫酸水溶液を噴霧し、加熱すると濃茶褐色を呈する。
- 10) 構造式



ン、ヘキサンに不溶である。

- 9) 薄層クロマトグラフィ〔TLC, プレコートシリカゲル 60 F₂₅₄, 0.25 mm, メルク社製、クロロホルム：メタノール：水(7:3:1, 下層)〕で R_f = 0.4 を示す。TLC 上 1% 硫酸セリウム-10% 硫酸水溶液を噴霧し、加熱すると濃茶褐色を呈する。
- 10) 構造式



アストラガロサイドⅢ

- 1) mp 245~247℃である。
- 2) $[\alpha]_D^{18} + 21.4^\circ$ (C = 0.8, メタノール) の旋光性を有する。
- 3) C₄₁H₆₈O₁₄·H₂O の分子組成を有する。
- 4) 赤外線吸収スペクトル (KBr, cm⁻¹) は 3370 (ブロード), 1070, 1030 に特有の吸収極大を示す。
- 5) 210 nm より長波長には紫外線吸収を示さない。
- 6) ¹³C 核磁気共鳴スペクトル (d₅-ピリジン, δ_C) は 105.8, 105.4 (アノメリック C), 88.8 (3-C), 87.4 (20-C), 83.1 (キシロース部分の 2'-C), 82.2 (24-C) 等のシグナルを示す。
- 7) 臭いはなく、無色の針状結晶 (メタノールから結晶化) である。
- 8) メタノール, エタノール, n-ブタノール, ピリジン, ジメチルスルホキシドに可溶、酢酸エチル, アセトン, エーテル, ベンゼ

アストラガロサイドⅣ

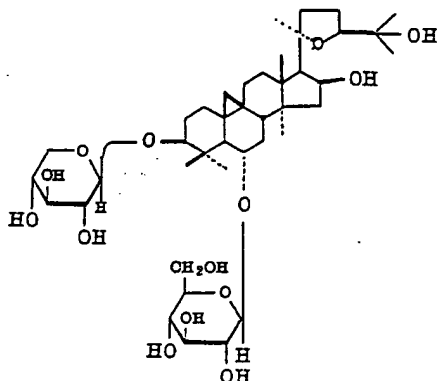
- 1) mp 299~301℃である。
- 2) $[\alpha]_D^{18} + 24.4^\circ$ (C = 0.2, メタノール) の旋光性を有する。
- 3) C₄₁H₆₈O₁₄·2H₂O の分子組成を有する。
- 4) 赤外線吸収スペクトル (KBr, cm⁻¹) は 3380 (ブロード), 1065, 1040 に特有の吸収極大を示す。
- 5) 210 nm より長波長には紫外線吸収を示さない。
- 6) ¹³C 核磁気共鳴スペクトル (d₅-ピリジン, δ_C) は 107.1, 105.0 (アノメリック C), 88.7 (3-C), 87.3 (20-C), 82.0 (24-C), 79.2 (6-C) 等のシグナルを示す。
- 7) 臭いはなく、無色の針状結晶 (メタノールから結晶化) である。
- 8) メタノール, エタノール, n-ブタノール, ピリジン, ジメチルスルホキシドに可溶、酢酸エチル, アセトン, エーテル, ベンゼ

ン、ヘキサンに不溶である。

- 9) 薄層クロマトグラフィ (TLC, プレコートシリカゲル 60 F₂₅₄, 0.25 mm, メルク社製、クロロホルム:メタノール:水 (7:3:1, 下層)) で R_f = 0.36 を示す。

TLC 上 1% 硫酸セリウム-10% 硫酸水溶液を噴霧し、加熱すると濃茶褐色を呈する。

10) 構造式

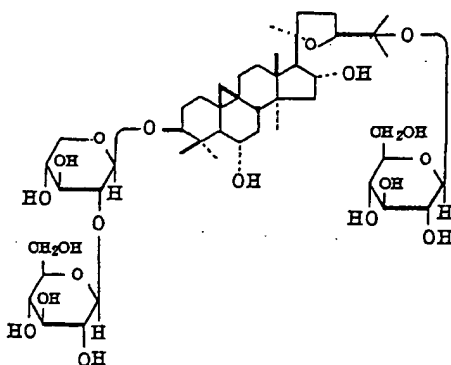


酢酸エチル、アセトン、クロロホルム、エーテル、ベンゼン、ヘキサンに不溶である。

- 9) 薄層クロマトグラフィ (TLC, プレコートシリカゲル 60 F₂₅₄, 0.25 mm, メルク社製、クロロホルム:メタノール:水 (7:3:1, 下層)) において R_f = 0.2 を示す。

TLC 上 1% 硫酸セリウム-10% 硫酸水溶液を噴霧し、加熱すると濃茶褐色を呈する。

10) 構造式



アストラガロサイド V

- 1) mp 202~204℃である。
- 2) $[\alpha]_D^{14} + 7.2^\circ$ (C = 1.0, メタノール) の旋光性を有する。
- 3) C₄₇H₇₈O₁₉ · 3H₂O の分子組成を有する。
- 4) 赤外線吸収スペクトル (KBr, cm⁻¹) は 3400 (ブロード), 1075, 1035 に特有の吸収極大を示す。
- 5) 210 nm より長波長には紫外線吸収を示さない。
- 6) ¹³C 核磁気共鳴スペクトル (d₅-ピリジン, δ_C) は 105.7, 105.8, 98.7 (アノメリック C), 88.6 (3-C), 87.2 (20-C), 88.0 (キシロース部分の 2'-C), 82.2 (24-C), 78.6 (25-C) 等のシグナルを示す。
- 7) 臭いはなく、無色の微細結晶 (メタノールから結晶化) である。
- 8) メタノール, エタノール, n-ブタノール, ピリジン, ジメチルスルホキシドに可溶、

アストラガロサイド VI

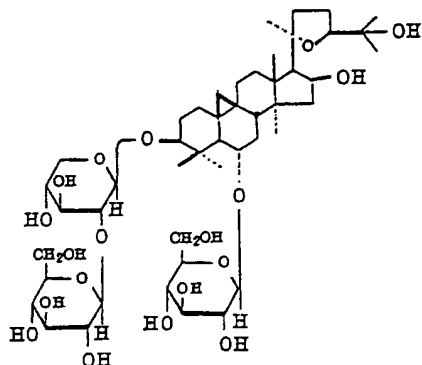
- 1) mp 290~291℃である。
- 2) $[\alpha]_D^{14} + 17.3^\circ$ (C = 1.0, メタノール) の旋光性を有する。
- 3) C₄₇H₇₈O₁₉ · H₂O の分子組成を有する。
- 4) 赤外線吸収スペクトル (KBr, cm⁻¹) は 3400 (ブロード), 1075, 1033 に特有の吸収極大を示す。
- 5) 210 nm より長波長には紫外線吸収を示さない。
- 6) ¹³C 核磁気共鳴スペクトル (d₅-ピリジン, δ_C) は 105.9, 105.2, 104.9 (アノメリック C), 88.5 (3-C), 87.2 (20-C), 83.5 (キシロース部分の 2'-C), 81.8 (24-C), 79.1 (6-C) 等のシグナルを示す。
- 7) 臭いはなく、無色の微細結晶 (メタノールから結晶化) である。
- 8) メタノール, エタノール, n-ブタノール, ピリジン, ジメチルスルホキシドに可溶、

酢酸エチル、アセトン、クロロホルム、ベンゼン、エーテル、ヘキサンに不溶である。

- 9) 薄層クロマトグラフィ〔TLC, プレコートシリカゲル60F₂₅₄, 0.25mm, メルク社製、クロロホルム：メタノール：水（7：3：1, 下層）〕において、
R_f = 0.19を示す。

TLC 上1%硫酸セリウム-10%硫酸水溶液を噴霧し、加熱すると濃茶褐色を呈する。

10) 構造式

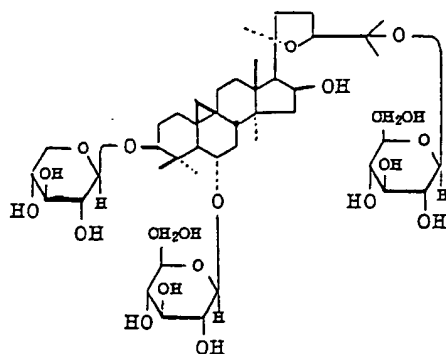


酢酸エチル、クロロホルム、アセトン、エーテル、ベンゼン、ヘキサンに不溶である。

- 9) 薄層クロマトグラフィ〔TLC, プレコートシリカゲル60F₂₅₄, 0.25mm, メルク社製、クロロホルム：メタノール：水（7：3：1, 下層）〕において
R_f = 0.18を示す。

TLC 上1%硫酸セリウム-10%硫酸水溶液を噴霧し、加熱すると濃茶褐色を呈する。

10) 構造式



アストラガロサイドⅦ

- 1) mp 292~293℃である。
- 2) $[\alpha]_D^{18} + 10.8^\circ$ (C = 0.6, メタノール) の旋光性を有する。
- 3) C₄₇H₇₆O₁₉ · 2H₂O の分子組成を有する。
- 4) 赤外線吸収スペクトル (KBr, cm⁻¹) は 3400 (ブロード), 1070, 1040 に特有の吸収極大を示す。
- 5) 210nm より長波長には紫外線吸収を示さない。
- 6) ¹³C 核磁気共鳴スペクトル (d₅-ピリジン, δC) は 107.3, 104.8, 98.8 (アノメリックC), 88.6 (3-C), 87.2 (20-C), 82.2 (24-C), 79.1 (6-C), 78.7 (25-C) 等のシグナルを示す。
- 7) 臭いはなく、無色の針状結晶 (メタノールから結晶化) である。
- 8) メタノール, エタノール, n-ブタノール, ピリジン, ジメチルスルホキシドに可溶、

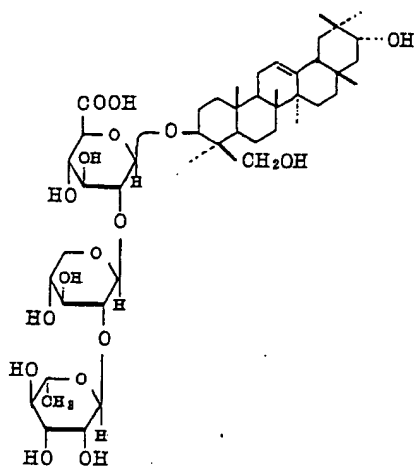
アストラガロサイドⅧ

- 1) mp 223~224℃である。
- 2) $[\alpha]_D^{18} - 12.1^\circ$ (C = 1.0, メタノール) の旋光性を有する。
- 3) C₄₇H₇₆O₁₇ · H₂O の分子組成を有する。
- 4) 赤外線吸収スペクトル (KBr, cm⁻¹) は 3400 (ブロード), 1725, 1040 に特有の吸収極大を示す。
- 5) 210nm より長波長には紫外線吸収を示さない。
- 6) 臭いはなく、無色の微細結晶 (メタノールから結晶化) である。
- 7) メタノール, ピリジン, ジメチルスルホキシドに易溶、エタノール, n-ブタノール, 水に可溶、クロロホルム, 酢酸エチル, アセトン, ベンゼン, ヘキサンに不溶である。
- 8) 薄層クロマトグラフィ〔TLC, プレコートシリカゲル60F₂₅₄, 0.25mm, メルク社製、クロロホルム：メタノール：水（7：3：1, 下層）〕において

Rf = 0.1を示す。

TLC 上1%硫酸セリウム-10%硫酸水溶液を噴霧し、加熱すると赤紫色を呈する。

9) 構造式



ml) した。

下記第1表には被検サポニンとして実施例で得たアセチルアストラガラサイドI、アストラガラサイドI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及びイソアストラガラサイドIを用いた場合の結果を示した。各被検薬は、アドリアマイシン投与1日前より体重10g当り0.10ml割合で腹腔内投与を開始し、5日間連続投与を行なった。なお、被検薬はいずれも使用直前に、0.9%生理食塩水もしくは1%ツイン80 (Tween 80) 含有0.9%生理食塩液に懸濁させて用いた。また各被検薬は毎日正午に投与し、アドリアマイシンのみは被検薬投与3時間後に投与した。各被検薬投与量は、各アストラガラサイドについて200mg/kgであり、また対照群のマウスには0.9%生理食塩水を投与した。

2) 過酸化脂質の測定は、各動物を6日目に頸椎脱臼にて屠殺し、速やかに心臓及び肝臓を摘出し、湿重量を測定した後、氷冷下ポッター型テフロンホモジナイザーで0.9%生理食塩水を用いて2%ホモジネート液を調製した。これを検液として次

次に本願発明のサポニンの過酸化脂質生成抑制作用の薬理試験結果を示す。

過酸化脂質生成抑制薬理試験

抗腫瘍薬、アドリアマイシンはDNAと結合して核酸合成を抑制すると共に心臓での脂質代謝を阻害して過酸化脂質を蓄積させ心筋障害を副作用として引起す事が広く知られている。

この発明の発明者らはこれを利用して、過酸化脂質生成抑制作用について、アセチルアストラガラサイドI、アストラガラサイドI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及びイソアストラガラサイドIのオウギ中に含まれるサポニン類の過酸化脂質抑制剤としての効力検定を行い、いずれも強い過酸化脂質抑制作用のあることを見出した。以下、具体的に試験結果を説明する。

(実験方法)

1) COF系雄性マウス(5週齢20~25g) 5匹ずつで構成された群を用い、各マウスにアドリアマイシン(協和薬工業製)を15mg/kgの用量で腹腔内投与(薬液量:体重10g当り0.15

の八木改良法を用いて過酸化脂質量を測定し、心臓、肝臓中の過酸化脂質を定量し対照群と比較した。

上記2%ホモジネート液0.2mlに3%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液0.5mlを加え、30秒振盪混和せしめ、これに酢酸緩衝液(pH 3.6)1.5ml及び0.8%チオバルピツクル酸溶液1.5mlを加え、蒸留水をもつて全容4.0mlとした後、30秒間よく振盪し、油浴中で60分間95℃で加熱後、5分間流水にて冷却する。次に0.2規定塩酸1.0ml、n-ブタノール/ピリジン(15:1)溶液5.0mlを加え、激しくふり混ぜた後、15分間遠心分離(3000rpm)に付し、上層のn-ブタノール層を分取し、蛍光分光光度計(Ex 515nm、Em 553nm)で蛍光度を測定する。別にマロンアルデヒド標準液を用いて本操作と同一の試験を行つた蛍光度と過酸化脂質量との関係を示す検量線を作成しておき、測定値をこれにあてはめ含有量を求めた。

(実験結果)

各被検薬、各投与量の作用を比較するため次式によつて過酸化脂質生成抑制率を求め、その結果を第1表に示す。

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{C - D}{C - A} \times 100$$

A : アドリアマイシンを投与しない群の過酸化脂質濃度

C : アドリアマイシンを投与した対照群の過酸化脂質濃度

D : アドリアマイシン及び被検薬を投与した群の過酸化脂質濃度

| 記号 | 投与薬剤 | 過酸化脂質 ($\mu\text{mol/g}$) | 抑制率 (%) |
|----|---|--------------------------------|------------|
| A | 投与薬剤なしの群 (正常群) | 275.95 ± 19.24 | |
| C | アドリアマイシン+0.9% 生理食塩水投与群(対照) | 540.62 ± 28.35 | 0 |
| D | アドリアマイシン +オウギガニン(アストラ ガロサイド類) 投与群 | | |
| | アセチルアストラガロサイドI | 472.34 ± 27.50 | 25.8 |
| | アストラガロサイドI | 483.45 ± 21.76 | 21.6 |
| | イソアストラガロサイドI | 478.69 ± 25.58 | 23.4 |
| | アストラガロサイドII | 491.39 ± 19.68 | 18.6 |
| | アストラガロサイドIII | 497.21 ± 20.21 | 16.4 |
| | アストラガロサイドIV | 485.03 ± 18.45 | 21.0 |
| | アストラガロサイドV | 481.07 ± 23.75 | 22.5 |
| | アストラガロサイドVI | 486.63 ± 18.04 | 20.4 |
| | アストラガロサイドVII | 488.74 ± 23.25 | 19.6 |
| | アストラガロサイドVIII | 385.26 ± 26.62 | 58.7 |

代理人 弁理士 野河信太郎



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)